



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE PER LO SVILUPPO PRODUTTIVO E LA COMPETITIVITA'
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

01297381

Il presente brevetto viene concesso per l'invenzione oggetto della domanda sotto specificata:

num. domanda	anno	U.P.I.C.A.	data pres. domanda	classifica
000269	1997	FIRENZE	09.12.1997	A61K

TITOLARE

SERIO MARIO
A. BAGNO A. RIPOLI (FIRENZE)
SALERNO ROBERTO
A. FIRENZE
CRESCIOTTI CLARA
A. FIRENZE

RAPPR. TE

BRIGHENTI LIVIO

INDIRIZZO

NOTARBARTOLO & GERVASI S. P. A.
LUNGARNO A. VESPUCCI 24
50100 FIRENZE

TITOLO

USO DI ANALOGHI DELLA VITAMINA D3 COME
INIBITORI DELLA PROLIFERAZIONE DI CELLULE

INVENTORE

SERIO MARIO
SALERNO ROBERTO
CRESCIOTTI CLARA

Roma, 1 SETTEMBRE 1999

IL DIRETTORE DELLA DIV. XVII

ATILIO BONGACCI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO MODULO A
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

marca
da
bollare

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **SERIO Mario** **PI**
Residenza **BAGNO A. RIPOLE** codice **SREMRA37B121991M**
2) Denominazione **SALERNO Roberto** **PI**
Residenza **FIRENZE** codice **SLRRRT525031206K**

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome e nome **BRIGHENTI Livio** cod. fiscale
Denominazione studio di appartenenza **NOTARBARTOLO & GERVASI SPA**
Via **Lungarno Amerigo Vespucci** n. **24** città **FIRENZE** cap. **50123** (prov) **FI**

C. DOMICILIO ELETTIVO del destinatario

Via _____ n. _____ città _____ cap. _____ (prov) _____

D. TITOLO

class. proposta (sezione) _____ gruppo sottogruppo _____
Uso di analoghi della Vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: ☐ SI ☒ NO

SESTANZA DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

Cognome e nome **SERIO Mario** **PI**
1) **SALERNO Roberto** **PI**
2) **CRESCIOTTI Chiara** **PI**

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione _____ tipo di priorità _____ numero di domanda _____ data di deposito _____ allegato ☐ SR
1) _____
2) _____

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI: denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc.	N. es.	Prov.	N. pag.	Descrizione
Doc. 1	1	PROV.	10	Riassunto con disegno principale; descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2	1	PROV.	03	disegno (obbligatorio se citato in descrizione; 1 esemplare)
Doc. 3	1	RS		lettera di incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4	0	RS		designazione inventore
Doc. 5	0	RS		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6	0	RS		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7	0			nominativa completa del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

confronto singole priorità

(9) attestati di versamento, totale lire

COMPILATO IL **09/12/1997** FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I) **NOTARBARTOLO & GERVASI SPA**
CONTINUA SINO **SI**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SINO **SI**UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. IN **FIRENZE** codice **48**VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI COMANDA **FI/97/A/269**L'anno milanesecento **Novantasette** il giorno **novè** del mese di **dicembre**N° (residente) (non residente) (non residente) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di n. **01** fogli e seguiti per la concessione del brevetto sopra riportato

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE

1) n. **2** attestazioni: una di L. **315.000** n. **379**
una di L. **50.000** n. **212** ambedue del **9/12/1997**

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

DOMANDA N. _____

REG

03

CRESCIOLI Clara

N.G.

Depositions

firenze

codice

CRS CLR60 C54 D6 12L

Residenza

Denominazione

Residenza

Denominazione

Residência**Denominazione**

“Rishikonda”

Denominazione

Residenza

Denominazione

Residenza

E. INVENTORI DESIGNATI

COGNOME NOME

СРОКОВ ПОСЛЕ

E. PRIORITÀ

nazionale o internazionale

Map of orienteering

...in demand

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

allegato

SCIOGLIMENTO RISERVA

Data:

4. Protocollo

FIRMA DEL(R) RICHIEDENTE ()

NOTARBARTOLO & GERVASI SPA

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI

RIASSUNTO, INVENZIONE, CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

FI/97/A/269

REG. A

DATA DI DEPOSITO

09/12/1997

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1998

L. TITOLO

Uso di analoghi della Vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana.

L. RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce all'uso di analoghi della Vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana e a composizioni farmaceutiche per detto uso.

M. DISEGNO

Domanda di Brevetto per invenzione industriale dal titolo:

Uso di analoghi della Vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana.

a nome CRESCIOLI Clara

residente in FIRENZE

a nome SALERNO Roberto

residente in FIRENZE

a nome SERIO Mario

residente in Bagno a Ripoli (FI)

inventori CRESCIOLI Clara, SALERNO Roberto, SERIO Mario

depositata il con il n°

1. Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce all'uso di analoghi della Vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana e a composizioni farmaceutiche per detto uso.

2. Stato della tecnica

L'ipertrofia prostatica benigna (BPH) è un problema clinico che si presenta con notevole frequenza nei maschi sopra i 55 anni d'età. In questa fascia d'età infatti, circa 2/3 dei soggetti hanno sintomi riferibili al prostatismo e circa il 25% vengono sottoposti, nel corso degli anni successivi, ad intervento chirurgico. Tali sintomi sono il risultato di due cause principali: la prima e più importante è l'ipertrofia della ghiandola prostatica con sviluppo di un adenoma perineurale che esercitando un'azione compressiva sull'uretra, induce un'ostruzione del flusso urinario. La seconda causa è rappresentata dall'aumento del tono della muscolatura liscia del collo vescicale (regolata dai recettori adrenergici alfa-1).

e della prostata stessa con conseguente ostacolo allo svuotamento vescicale.

L'ormone responsabile della crescita prostatica è il diidrotestosterone (DHT).

Un potente androgeno che si forma dal testosterone mediante una reazione catalizzata dall'enzima 5-alfa-reduttasi.

È noto che la finasteride è un inibitore competitivo della 5-alfa-reduttasi (prevalentemente su quella di tipo 2) senza effetti sulla sintesi o l'azione di altri ormoni.

Negli ultimi 5 anni sono stati portati a termine diversi studi clinici controllati in pazienti affetti da BPH (vedi ad esempio New England J. of Medicine, Vol.

327, pag. 1185-1191, 1992) in cui è confrontato l'effetto di 1 e 5 mg di finasteride rispetto al placebo in 895 pazienti.

Studi successivi hanno dimostrato che il trattamento per due anni ha indotto significativamente il rischio di ritenzione urinaria acuta, una complicanza che è responsabile del 25% circa delle prostatectomie, sono stati però rilevati anche effetti collaterali quali, in particolare, un ridotto volume dell'ejaculato ed una perdita della libido in meno del 5% dei pazienti.

Altri studi sono stati condotti relativamente agli effetti prodotti dagli alfa-bloccanti, ad esempio il terazosin, un bloccante selettivo dei recettori adrenergici alfa 1 (vedi J. of Urology, Vol. 148, pag. 1467-1474, 1992) in cui si

segnala che un miglioramento dello score dei sintomi è stato registrato nel 30% circa dei pazienti, il miglioramento si è dimostrato essere dose-

dipendente (26% di risposte positive con 1 mg, 52% con 10 mg). I più comuni effetti collaterali riscontrati sono stati vertigini, ipotensione posturale ed

astenia. L'incidenza di sincope è stata inferiore allo 0,5% alla dose di 1 mg e del 1,3% alla dose di 10 mg.

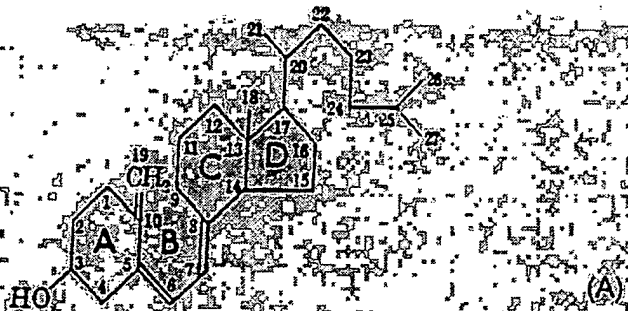
Nessun effetto positivo aggiuntivo è stato dimostrato con la somministrazione di entrambi i farmaci.

E' evidente da quanto detto sopra la necessità di disporre di nuovi e più efficaci mezzi capaci di risolvere la patologia suddetta senza presentare gli effetti collaterali indesiderati suddetti.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

E' stato ora sorprendentemente trovato ed è un oggetto della presente invenzione, che analoghi della Vitamina D3 consentono di inibire la proliferazione di cellule peritroliche di prostata umana e quindi questi prodotti possono rivelarsi utili nel trattamento di questa patologia.

E' noto che con il termine di analoghi della Vitamina D3 s'intende un vasto gruppo di prodotti che posseggono la struttura base della Vitamina D3 (A).



[vedi ad esempio: A.W. Norman: The Vitamin D Endocrine System: Manipulation of Structure-Function Relationship to Provide Opportunities for Development of New Cancer Chemopreventive and Immunosuppressive Agents, J. of Cellular Biochemistry Supplement 22:218-225 (1995) e M.J. Campbell et al.: Vitamin D Analogs and their 24-Oxo Metabolites equally inhibit clonal proliferation of a variety of cancer cells but have differing molecular effects, J. of Cellular Biochemistry 66:413-425 (1997)].

La Vitamina D3 è metabolizzata nel fegato a 25-OH-vitamina D3 e quindi nel

rene a 1,25-(OH)₂ vitamina D₃ (calcitriolo, CT). La vitamina D₃ ed i suoi analoghi svolgono un ruolo fondamentale nella omeostasi fosfo-calcica e inducono una riduzione della proliferazione ed aumento della differenziazione di linfociti, monociti, fibroblasti, cheratinociti, melanociti, osteoclasti e osteoblasti.

Gli analoghi della vitamina D₃ sono capaci di differenziare i due effetti (calcemico e antiproliferativo/differenziativo). Tali modifiche infatti non alterano sostanzialmente il legame con il recettore mentre riducono la degradazione metabolica e l'affinità di legame con le proteine plasmatiche che legano la vitamina D ed i suoi metaboliti (DBP).

Un altro importante aspetto che caratterizza la farmacocinetica di tali composti è la possibilità che possano andare incontro alla degradazione metabolica indotta dall'enzima 24-idrossilasi, un enzima che è indotto nel rene e nell'intestino dalla vitamina D stessa. La cascata catabolica indotta da tale enzima (cosiddetta ossidazione C-24) conduce all'eliminazione metabolica dell'1,25 (OH)₂ D₃ (per circa il 35-40%) e del suo precursore 25-OH-D₃ le altre vie cataboliche sono rappresentate da altre ossidazioni della catena laterale e dall'escrezione biliare dei metaboliti polari.

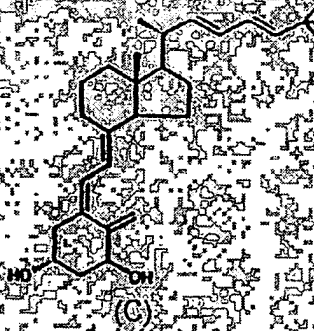
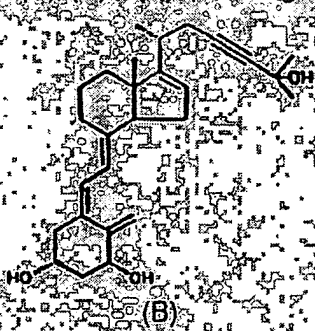
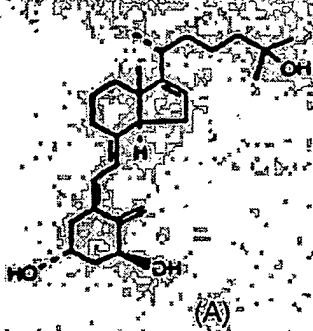
Tuttavia non è mai stato riportato (vedi ad esempio H. A. Pols et al. Vitamin D analogues: from molecule to clinical application. Clinical Endocrinology 40: 285-91 (1994), e Daniel D. Bikle. Clinical Counterpoint: Vitamin D: New Actions, New Analogs, New Therapeutic Potential. Endocrine Reviews, Vol. 13, No. 4 (1992)) che analoghi della Vitamina D₃ possano avere un'azione anche nel caso della ipertrofia prostatica benigna.

In particolare la presente invenzione si riferisce agli analoghi della Vitamina

D3 che presentano in posizione 17 una catena C_{12} alchile lineare o ramificata, preferibilmente C_{12} alchile contenente uno o più doppi o tripli legami ed eventualmente un doppio legame in posizione 16 ed eventualmente un gruppo oxo, in particolare in posizione 24.

Secondo un ulteriore particolare aspetto la presente invenzione si riferisce ad analoghi della Vitamina D3 contenenti due o più gruppi OH, preferibilmente in posizione 1, 3 e 25.

Più in particolare l'invenzione si riferisce ai composti: 1,25-(OH)₂-16-ene-D3, 1,25-(OH)₂-16-ene-23-yne-D3 (indicati in letteratura (Hoffmann-La Roche) rispettivamente con le sigle RO 24-2637 e RO 23-7553) e 1,25-(OH)₂-22,24-diene-24,26,27-trihomovitamina D3 (indicata in letteratura (Leo Pharmaceuticals Products Ltd.) con la sigla EB 1089) e rappresentati rispettivamente dalle formule (A), (B) e (C) qui di seguito riportate.



È stata verificata l'azione dei tre analoghi della vitamina D3 suddetti su cellule di prostata umana ipertrofica e sulle stesse cellule trattate con Keratocyte Growth Factor (KGF). Il KGF, che appartiene alla famiglia dei Fibroblast Growth Factors, è uno dei più potenti fattori di crescita della prostata. In lavori precedentemente effettuati nel nostro laboratorio (in corso di stampa sul J. Clinical Endocrinology and Metabolism) è stata dimostrata l'espressione del KGF e del recettore del KGF nel tessuto prostatico ipertrofico, e stato altresì

dimostrato che il KGF ricombinante (hKGF) induce un effetto stimolatorio su cellule di prostata ipertrofica in cultura a concentrazioni di 1 ng/ml. L'effetto inibitorio degli analoghi della vitamina D3 è stato infine confrontato con quello esercitato da un antiandrogeno non steroideo (bicalutamide, nome commerciale Casodex-Zeneca).

La presente invenzione si riferisce anche a composizioni farmaceutiche contenenti i prodotti suddetti.

Tali composizioni possono essere preparate secondo le tecniche note in farmacopea per la preparazione di formulazioni per la somministrazione orale, parenterale, intramuscolare, rettale, in particolare parenterale.

È stata misurata in vitro un'interessante attività a concentrazioni comprese fra 0,1 e 100 nM.

Esempio

Mezzi di cultura, antibiotici e collagenasi sono stati ottenuti da Sigma (St. Louis, MO); il FBS (fetal bovine serum) da Unipath. Il hKGF (Human keratocyte growth factor) è stato ottenuto da Boehringer Mannheim Biomedica. Gli analoghi della vitamina D, 1,25 (OH)₂-16-ene-D3 (Ro-24-2637) e 1,25 (OH)₂-16-ene-23-yne-D3 (Ro-23-7553) sono stati ottenuti da Roche, la bicalutamide (Casodex) da Zeneca Pharmaceutical (Macclesfield, Cheshire, England).

Le cellule prostatiche ipertrofiche umane sono state ottenute da campioni chirurgici di soggetti affetti da BPH e sottoposti ad intervento di prostatectomia radicale. Il tessuto prostatico è stato diviso in piccoli frammenti e trattato per 12 ore con 2 mg/ml di collagenasi batterica (700 U/ml); i frammenti sono stati successivamente lavati in PBS e fatti crescere nel mezzo di cultura (MEM supplementato con FBS al 10% inattivato a caldo, glutamina 2mM, 100 U e 100

ug/ml rispettivamente di penicillina e streptomina. La crescita cellulare è apparente dopo 1 settimana, le cellule sono state utilizzate entro il quinto passaggio. Per la misura della crescita cellulare, 55×10^3 cellule/cm² sono state piastrate nel mezzo di cultura in una piastra da 12 pozzetti. Dopo 24 ore il mezzo di cultura è stato rimosso e le cellule accuratamente lavate in PBS. Successivamente sono state incubate in mezzo senza rosso fenolo contenente 0.5% di albumina bovina (BSA) e hKGF alle concentrazioni di 0.1, 1, 10 e 100 ng/ml. Alle colture sono stati aggiunti gli analoghi della vitamina D3, RO 23-7553 e RO 24-2637, alla concentrazione di 10 nM oppure Casodex alla concentrazione di 1 μ M. Cellule in mezzo privo di rosso fenolo contenente 0.5% di BSA e cellule stimulate da 10 ng/ml di KGF sono state usate rispettivamente come controllo. Dopo 48 ore le cellule sono state tripsinizzate e contate con un emocitometro. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in doppio e ripetute almeno tre volte. I risultati sono espressi come numero di cellule/ml. I dati sono espressi come media \pm SD. Le medie sono state confrontate mediante test di Student.

Nella figura 1 viene mostrato l'effetto inibitorio del composto RO 23-7553 sulla proliferazione delle cellule di BPH. In figura 2 è mostrato l'effetto inibitorio del composto RO 23-7553 (alla concentrazione di 10 nM) sulla proliferazione di cellule BPH trattate con hKGF secondo le concentrazioni indicate in ascissa; nella figura 3 è indicato, per confronto, l'effetto inibitorio sulle stesse cellule dell'antiandrogeno bicalutamide (Casodex) alla concentrazione di 1 μ M. Come si può vedere confrontando le figure 2 e 3 l'attività del prodotto commerciale è comparabile a quella del prodotto secondo l'invenzione ma a concentrazioni 100 volte superiori.

RIVENDICAZIONI

1. Analoghi della vitamina D3 come inibitori della proliferazione di cellule ipertrofiche di prostata umana.

2. Analoghi secondo la rivendicazione 1 in cui in posizione 17, è presente un gruppo C=C alchile, lineare o ramificato, contenente uno o più doppi o tripli legami ed eventualmente un gruppo oxo.

3. Analoghi secondo la rivendicazione 2 in cui la catena in posizione 17 è una catena C alchile.

4. Analoghi secondo la rivendicazione 3 in cui in posizione 16, è presente un doppio legame.

5. Analoghi secondo la rivendicazione 4 contenenti due o più gruppi OH.

6. Analoghi secondo la rivendicazione 5 in cui i gruppi OH sono presenti nelle posizioni 1, 3 e 25.

7. Analoghi secondo la rivendicazione 6 rappresentati da 1,25-(OH)₂-16-ene-D3, 1,25-(OH)-16-ene-23-yne-D3 e 1,25-(OH)-2,22,24-diene-24,26,27-trihomovitamina D3.

8. Composizioni farmaceutiche per l'inibizione della proliferazione di cellule prostatiche benigne contenenti come principio attivo un composto secondo la rivendicazione 7 eventualmente in combinazione con gli usuali additivi farmacologicamente accettabili per la somministrazione parenterale.

9. Processo per l'inibizione della proliferazione di cellule di prostata umana in cui il principio attivo è presente in quantità comprese fra 0,1 e 100 nM.

Firenze, li

p. Crescioli Clara, Salerno Roberto e Seno Mario

Il Mandatario

R. R. L.

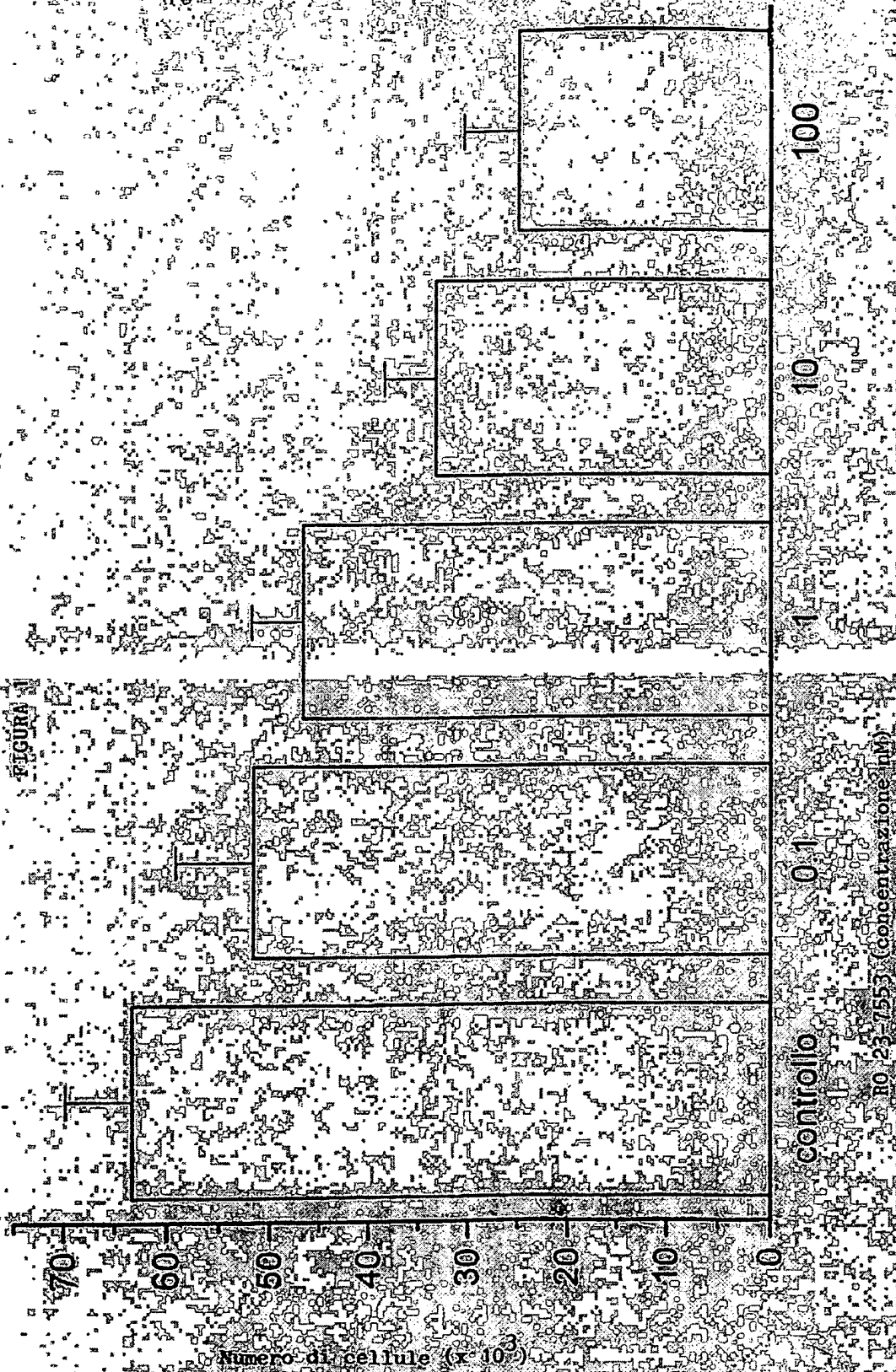
Dr. Livio Brighenti

della Notarbartolo & Gervasi S.p.A.



AS

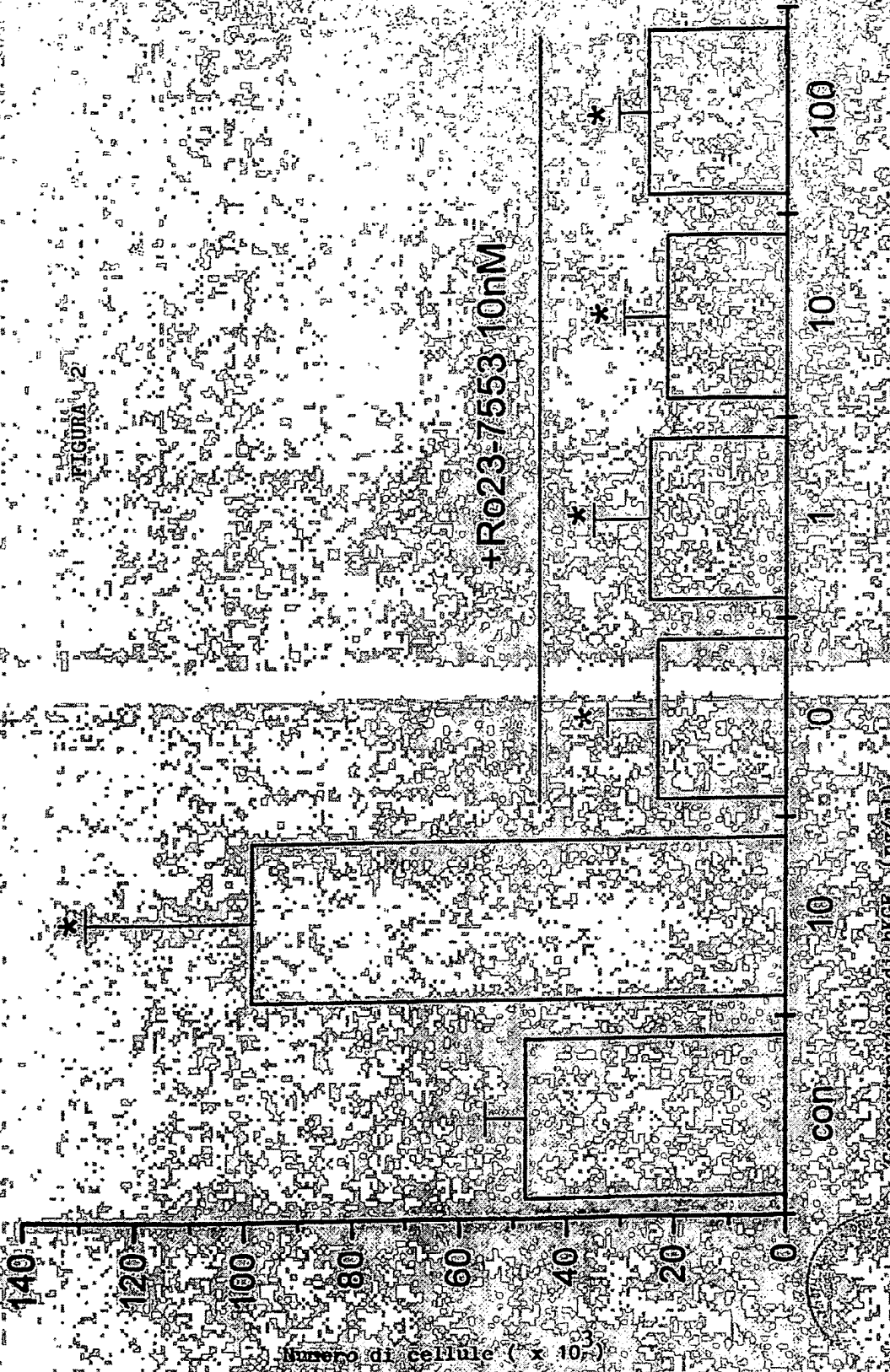
Luigi Righini



Ren. Ruffini

FIGURA 2

+R023-7553 10nM



Numero di cellule ($\times 10^3$)

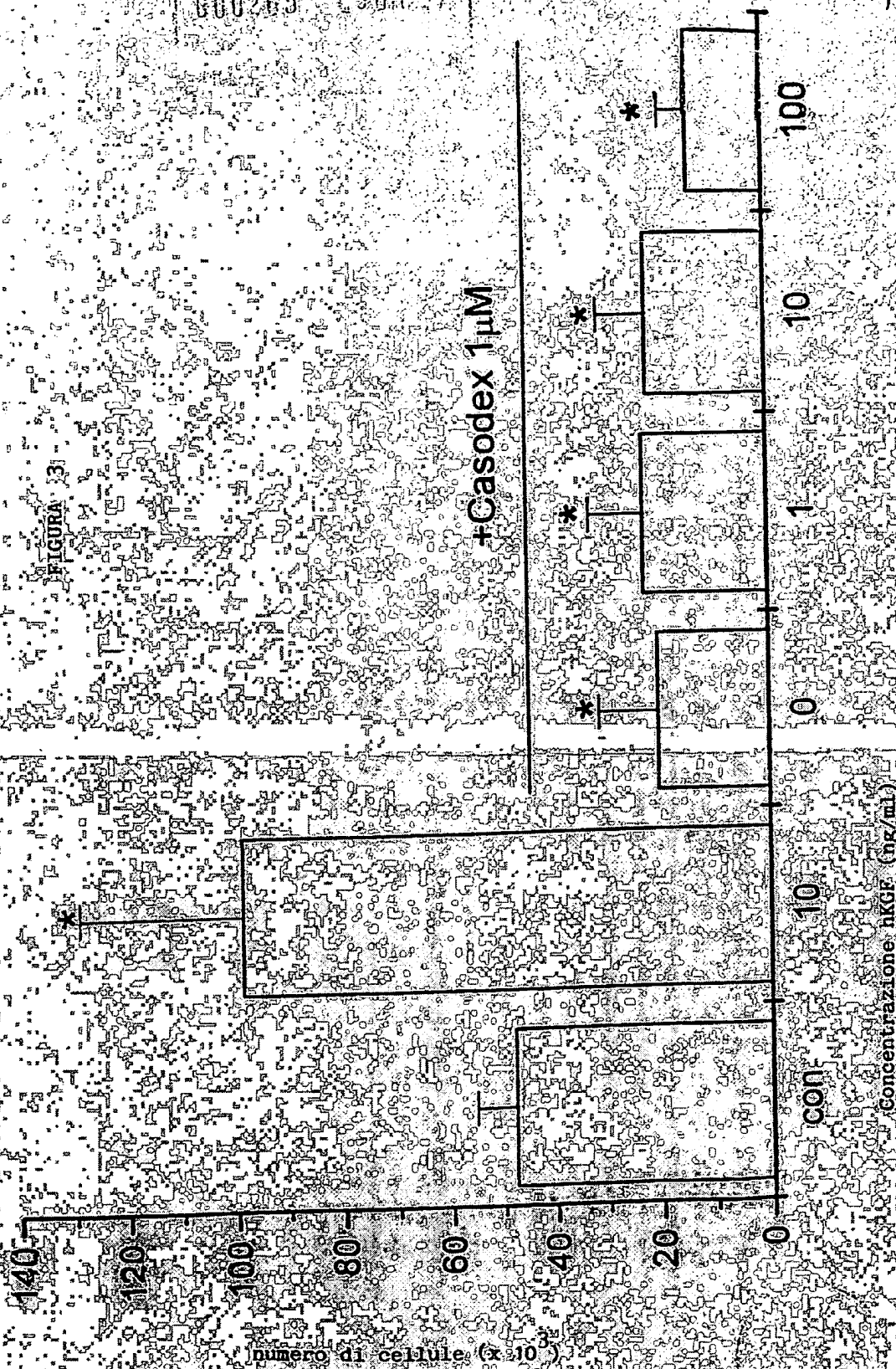
Concentrazione di hCG (ng/ml)

URP

100

000269 1901057

FIGURA 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.